

PRODUCCIÓN IN VITRO DE MICROBULBOS DE LIRIO (*Lilium* sp)

IN VITRO PRODUCTION OF LILIUM (*Lilium* sp) MICROBULBLETS

Dagoberto Castro¹ y Santiago Londoño¹

Recibido para evaluación: Diciembre 12 de 2007 - Aceptado para publicación: Marzo 28 de 2008

RESUMEN

Se desarrolló un método eficiente para la propagación de *Lilium* sp mediante el empleo de escamas tomadas a partir de bulbos del híbrido “Casablanca”. Las secciones de escamas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0.5%) durante 15 minutos y peróxido de hidrógeno (0.03%) durante dos minutos y se establecieron en un medio de cultivo compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog y suplementado con benciladenina (0.05 mg L⁻¹). Para la inducción y diferenciación de microbulbos se encontró que el ácido naftalenacético (0.1 mg L⁻¹), presentó el mejor efecto sobre el porcentaje de explantes diferenciados y el número de microbulbos formados por explante. En la fase de proliferación cuando se empleó la kinetina (1.0 mg L⁻¹) más sacarosa (60 g L⁻¹) presentó el mayor número de bulbos (3.9), con un 75% de explantes diferenciados y los mayores valores de masas seca y fresca. Durante la fase de aclimatización se obtuvo un 96.4% de prendimiento y al cabo de 45 días se formó el primer minibulbo.

Palabras claves: *lilium*, organogénesis directa, regeneración, minibulbos, microbulbos.

SUMMARY

An efficient method was developed for the propagation of *Lilium* sp by means of bulb scales as explants of the hybrid “Casablanca”. The sections of scales were disinfected during 15 minutes with sodium hypochlorite (0.5%) and peroxide of hydrogen (0.03%) during two minutes. The explants were placed on the medium consisting of Murashige and Skoog salts supplemented with BAP (0.05 mg L⁻¹). For the induction and differentiation of microbulblets, it was found that NAA (0.1 mg L⁻¹) showed the best effect. In the proliferation phase, kinetina (1.0 mg L⁻¹) plus sucrose (60 g L⁻¹) induced the highest bulblet number (3.9) with 75% differentiated explants and the highest fresh and dry masses values as well. During the acclimatization phase 96.4% surviving was achieved and 45 days after establishment formed the first minibulb.

Key words: *lilium*, direct organogenesis, regeneration, microbulbulet, minibulbulet.

¹Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología, Rionegro - Antioquia, AA.008 Tel (4) 531 6666, Fax (4) 531 3972. Email: dcastro@uco.edu.co

INTRODUCCIÓN

El género *Lilium* comprende unas 100 especies distribuidas en las regiones templadas del hemisferio boreal; una docena de ellas son nativas de Europa y dos de América del Norte, mientras que 50 a 60 especies se encuentran en Asia (Baranova, 1990, citado por Pelkonen, 2005). El *Lilium* es una flor de corte y de maceta muy apreciada por el consumidor, lo que asegura una buena demanda en el mercado. En Colombia actualmente, los cultivos de *Lilium* se establecen principalmente en la sabana de Bogotá y Antioquia, y las exportaciones van dirigidas principalmente al mercado Norte Americano. Para el año 2002 223.099 tallos fueron exportados y para el año 2003 entre los meses de enero a marzo se comercializaron 156.107 tallos, lo que indica un crecimiento notorio en los mercados internacionales (Asocolflores, 2003).

Se han desarrollado muchas investigaciones referentes a la regeneración de bulbillos a partir de escamas (Varshney *et al.*, 2000; Lian *et al.*, 2003), en la actualidad es el método de propagación vegetativa. Los bulbillos tienen algunas ventajas para la propagación masiva de *Lilium*, porque son más tolerantes a la manipulación y pueden ser sembrados de manera similar a las semillas, por lo tanto se disminuyen los costos de establecimiento. Las técnicas de cultivo de tejidos se han empleado para el mejoramiento y la propagación de los lirios (Stimart y Ascher, 1978; Pelkonen, 2005). En general los tejidos de los lirios tienen un alto potencial de regeneración (George, 1996), en particular las escamas de los bulbos tienen la mejor capacidad para inducir la formación de bulbos adventicios (Takayama y Misawa, 1979); sin embargo, por ser una parte que se desarrolla bajo el suelo estos tejidos presentan mayores porcentajes de contaminación. En algunos casos estos problemas han sido superados mediante el empleo de de ápices de brotes y entrenudos como material inicial (Godo *et al.*, 1996; Nhut, 1998).

El medio de cultivo que se ha empleado para la propagación, en la mayoría de los casos corresponde al MS (Murashige y Skoog, 1962), aunque en algunas ocasiones se han empleado otros tales como LS (Linsmaier y Skoog, 1965) y el medio White (White, 1963). Con relación a la formación de microbulbos, se sabe que la sacarosa estimula la formación de órganos de reserva en las plantas bulbosas (Chow *et al.*, 1992; Gerrits y de Klerk, 1992; Vreugdenhil y Helder, 1992). El objetivo de la presente investigación fue contribuir a mejorar los procesos de propagación del *Lilium* sp. para la obtención de microbulbos en condiciones in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron 10 bulbos de *Lilium* sp. procedentes del híbrido asiático "Casablanca". Estos materiales se almacenaron durante dos meses a 4 °C con el fin de superar la dormancia del material vegetal. Se descartaron materiales que mostraron signos de presencia de hongos o bacterias (Figura 2A).

Desinfección y establecimiento de los explantes

Como fuente de explantes se emplearon las escamas de los bulbos (Figura 2B), las cuales se colocaron en una solución de yodo (1%) durante 15 minutos, luego el material se secó sobre un papel absorbente. Se evaluaron dos tratamientos de desinfección: a) inmersión en etanol al 70% durante dos minutos y enjuague con agua destilada estéril; posteriormente se empleó el hipoclorito de sodio al 0.5% más una gota de Tween 20®, durante 15 minutos en inmersión, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y peróxido de hidrogeno al 0.03% durante dos minutos en inmersión y un enjuague con agua destilada estéril; y b) un tratamiento similar al anterior pero omitiendo el peróxido de hidrógeno.

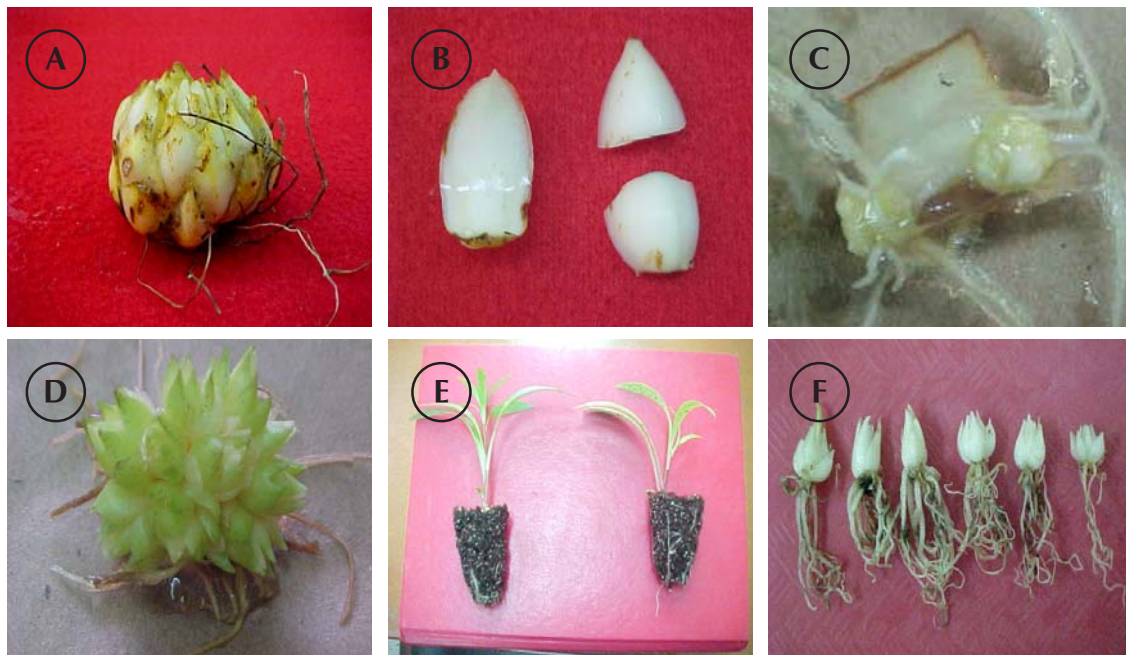


Figura 2. Regeneración *in vitro* de *Lilium* sp a partir de escamas (A = Bulbo madre. B = Secciones de escamas: 1. Sección distal, 2. Sección proximal. C = Inducción de microbulbos. D = Microbulbo diferenciado. E = Plántula aclimatizada a los 30 días de edad. F = Minibulbo 45 días después de sembrado.

Al terminar el proceso de desinfección se aislaron los explantes, diferenciando la posición de la escama en el bulbo así: internas, medias y externas. De igual manera se identificó la polaridad de los segmentos (Figura 2B) proveniente de la escama en segmento basal (proximal) y segmento superior (distal). Se empleó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) con las sales de nitrato de amonio y nitrato de potasio diluidas a la mitad, enriquecido con la citoquinina 6-bencil adenina (BAP 0.05 mg L^{-1}), glutamina 0.5 mg L^{-1} , vitaminas MS, sacarosa (30 g L^{-1}) más gel-rite (2.4 g L^{-1}). El medio de cultivo se esterilizó durante 20 minutos a una temperatura de 121°C y el pH se ajustó previamente a 5.8.

Se empleó un experimento $2 \times 3 \times 2$, donde los factores correspondieron a la presencia o ausencia del peróxido de hidrógeno, la posición de la escama en el bulbo y la polaridad de los segmentos, con un diseño

completamente al azar. Se emplearon 12 tratamientos con tres repeticiones para un total de 36 unidades experimentales por tratamiento. Las variables evaluadas correspondieron a porcentaje de contaminación y porcentaje de formación de microbulbos en los explantes. Para realizar esta evaluación el material permaneció durante ocho semanas en oscuridad con una temperatura media de 22°C .

Efecto del ácido naftalenacético (ANA) y la orientación del segmento de las escamas sobre la inducción y diferenciación de microbulbos

Para la inducción y diferenciación de los microbulbos se empleó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), solidificado con gel-rite (2.4 g L^{-1}) y se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (0.0 , 0.1 y 0.5 mg L^{-1}) de ANA. Se utilizó un experimento bifactorial en un diseño completamente al azar con 12 tratamiento con tres repeticiones. Con

el propósito de establecer diferencias entre los tratamientos se realizó el test de Duncan con una probabilidad del 99.9%. Las variables evaluadas fueron porcentaje de explantes inducidos y número de microbulbos formados. En este medio para inducción permanecieron 8 semanas en oscuridad con una temperatura media de 22 °C.

Evaluación del efecto de la kinetina y varias concentraciones de sacarosa sobre la proliferación de microbulbos

Se evaluó el efecto de diferentes niveles de kinetina (0.0, 1.0, 3.0 y 5.0 mg L⁻¹) y sacarosa (3.0%, 6.0% y 9.0%) sobre la proliferación de microbulbos *in vitro*. Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), solidificado con gel-rite (2.4 g L⁻¹) y los cultivos permanecieron ocho semanas en oscuridad con una temperatura media de 22 °C. Se empleó un experimento bifactorial en un diseño completamente al azar con 12 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas fueron número de microbulbos por explante, porcentaje de explantes diferenciados, masa fresca y masa seca. Para la medición de la masa seca los microbulbos obtenidos se llevaron a la estufa por 72 horas a 70 °C, hasta obtener un peso constante.

Etapas de aclimatación

Para lograr una adecuada aclimatación de los microbulbos producidos con los tratamientos de kinetina y sacarosa, se realizó una siembra en turba en bandejas de semillero de 200 alvéolos. Posteriormente, se trasladaron al invernadero y se mantuvieron con alta humedad relativa (90%); la luminosidad fue controlada con una polisombra del 60% y cámara húmeda con plástico. A partir de ese momento se mantuvo la humedad de la turba a capacidad de campo realizando nebulizaciones periódicas, adicionalmente se realizó una fertilización foliar con Wuxal® o Total®, (1 mL L⁻¹), en combinación con una

mezcla de nutrientes compuesto por fosfito de potasio (2 g L⁻¹) y nitrato de amonio (1 g L⁻¹). Las plantas permanecieron bajo estas condiciones durante dos semanas, tiempo durante el cual se logró el endurecimiento de los microbulbos luego se disminuyó la humedad relativa al 80% y las plántulas permanecieron durante 45 días, hasta que las hojas se secaron y se formó el primer minibulbo. Las variables que se evaluaron correspondieron a porcentaje de prendimiento, longitud de las plantas, número de hojas y peso del bulbo.

Análisis estadístico

Las variables analizadas se sometieron a prueba de normalidad y de varianza mediante las pruebas de Cochran y Bartlett. Cuando los datos no presentaron la normalidad se realizó la transformación a $X' = (X)^{1/2}$, mientras los datos correspondientes a porcentajes se transformaron a $X' = 2\text{seno}^{-1} (X/100)^{1/2}$. La información obtenida se procesó por análisis de varianza simple o multifactorial y prueba de rangos múltiples de Duncan para la comparación de medidas. Cuando se compararon dos muestras se utilizó la prueba T de Student, para el procesamiento estadístico se utilizó el programa de Statgraphics Plus, versión 5, (2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección y efecto de la localización y orientación del explante

De acuerdo con los resultados que se presentan en la tabla 1, no se encontró interacción entre los tres factores evaluados; por lo tanto, se analizó de manera independiente cada factor. El peróxido de hidrógeno cuando se empleó a una concentración del 0.03% presentó efectos sobre la disminución de la contaminación; sin embargo, la inducción de microbulbos

Tabla 1. Efecto del Peroxido de Hidrógeno, localización de la escama y orientación del explante en los porcentajes de contaminación e inducción de microbulbos en *Lilium* sp.

Factor	Contaminación (%)	Inducción de microbulbos (%)
A. Peróxido de hidrógeno (%)		
0.0	24.30b*	64.93
0.03	37.22a	70.00
Media general (MG)		67.46
B. Localización de la escama		
Interna	30.41	64.58
Media	31.45	67.16
Externa	40.41	70.75
Media general (MG)	32.25	67.46
C. Orientación del explante		
Proximal	36.60	91.71a
Distal	24.86	43.22b
Media general (MG)	30.76	
Interacciones:		
A*B*C	NS	
A*C		**

*Promedios con letras diferentes, presentaron diferencia significativa por el test de Duncan ($P < 0.05$).

no se vio afectada (67.46). La respuesta obtenida se debe a la capacidad oxidante del producto y el efecto sobre las membranas de los patógenos. La adición de bajas concentraciones del desinfectante en mención al medio de cultivo y al tratamiento de los explantes, ha resultado en el control de la contaminación en el cultivo de varias especies de lirios coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Takayama y Misawa, 1979).

Respecto a la localización de la escama, no se encontraron diferencias significativas. El porcentaje promedio de contaminación correspondió al 32.25% y la inducción de microbulbos alcanzó el 67.46%. Sin embargo, George (1996) reportó que las secciones externas de bulbos de *Lilium* sp, se contaminan más a menudo que las medias e internas. En la orientación de los explantes la desinfección no presentó diferencias; sin

embargo, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de inducción de microbulbos. Se determinó que los explantes procedentes de la región proximal presentaron un 91.7% de diferenciación, mientras que la región distal disminuyó la diferenciación al 43.2%. En la mayoría de las especies la formación de yemas adventicias se inducen principalmente en las bases, región proximal. Lo anterior se explica por la presencia de una mayor cantidad de células meristemáticas en comparación con la región distal; estos resultados coinciden con los obtenidos en especies de interés frutícola (Welandar, 1988) y el efecto de la polaridad que está relacionada con el intercambio electrogénico de iones de hidrógeno (H^+) y de potasio al plasmalema, que de acuerdo con Raven (1979) mantiene el transporte de auxinas endógenas con la capacidad de promover organogénesis.

Evaluación del efecto del ácido naftalenacético (ANA) y la orientación del segmento de las escamas en la inducción y diferenciación de los microbulbos

De acuerdo con los resultados que se presentan en la tabla 2, no se encontró interacción entre los factores evaluados; por lo tanto, se evaluó de manera independiente cada factor. El ácido naftalenacético empleado en la concentración de 0.1 mg L^{-1} presentó el mejor efecto sobre el porcentaje de explantes con diferenciación y sobre el número de microbulbos por explante, aunque en el caso del porcentaje de explantes no hubo diferencias significativas en ausencia de ANA. En concentraciones mayores de ANA se obtuvo una disminución en la respuesta de estas variables; estas respuestas pueden estar relacionadas con posibles bloqueos en las señales de la organogénesis.

La inducción de brotes en el testigo, posiblemente se deba al contenido endógeno de reguladores de crecimiento presente en los segmentos de escama de *Lilium*. Algunas especies son cultivadas sin adición de ningún regulador externo, probablemente debido a

que existe suficiente cantidad endógena de hormonas (Perez, 1998). Sin embargo, en los resultados obtenidos por Dabrowski *et al.* (1992) se obtuvo la proporción más alta de formación del bulbos de explantes de bulbos de *Lilium 'Sonnentiger'* cuando el medio fue suplementado con 0.1 mg L^{-1} de ANA y 3.0 o 0.3 mg L^{-1} de kinetina. El ANA ha sido la auxina que mejor respuesta ha presentado con relación a la inducción de microbulbos en los explantes e incluso, de manera natural se acumulan auxinas en los tejidos de los brotes, de tal manera que se puede inducir formación de microbulbos sin la adición de reguladores de crecimiento, lo cual confirma los resultados obtenidos en la propagación de diferentes especies de lirio (George, 1996).

En la orientación de los explantes no se presentaron diferencias significativas respecto al porcentaje de explantes diferenciados (35%) y al número de bulbos por explante (1.8). Este hecho pudo ser causado por una pérdida de la polaridad debido a la adición exógena del ANA, hecho que se corrobora con las investigaciones realizadas por George (1969). Igualmente, se observó que el empleo de ANA

Tabla 2. Efecto del ácido naftalenacético (ANA) y la orientación del explante en el porcentaje de explantes diferenciados y el número de bulbos por explante en *Lilium* sp.

Factor	Explantes diferenciados (%)	Número de bulbos por explante
A. ANA (mg L^{-1})		
0.0	75.0a*	3.3b
0.1	87.5a	4.7a
0.5	5.55b	1.0b
1.0	3.50b	1.0b
5.0	7.28b	0.1c
B. Orientación del explante		
Distal	33.3	1.9
Proximal	36.8	1.8
Media general	35.0	1.8
Interacciones		
A*B	NS	NS

*Promedios con letras diferentes, presentaron diferencia significativa por el test de Duncan ($P < 0.05$).

(0.1 mg L⁻¹) permitió la formación de microbulbos con una coloración blanco-amarillenta, estructuras definidas, buena formación de raíz y tamaño (Figura 2C).

Evaluación del efecto de la kinetina y varias concentraciones de sacarosa sobre la proliferación de microbulbos

De acuerdo con los resultados que se presentan en la tabla 3 no se encontraron interacciones entre los factores evaluados; por lo tanto, estos se analizaron de manera independiente. Cuando se adicionó al medio de cultivo kinetina (1.0 mg L⁻¹) se lograron los mejores resultados con relación al número de microbulbos (3.9), la masa fresca (0.17 g) y la masa seca (0.032 g); mientras que el porcentaje de explantes diferenciados no mostró diferencias estadísticas significativas en los tratamientos utilizados. Al revisar el testigo sin la presencia de la kinetina, se observó la formación de microbulbos y diferenciación del 75% de los explantes; esta respuesta se puede explicar por los contenidos endógenos de esta citoquinina en los explantes, por lo que se

requirió fue llegar a una concentración óptima para obtener las mejores respuestas. Una tendencia que se observó es que al incrementar las concentraciones de kinetina (3 mg L⁻¹ y 5 mg L⁻¹) se comportaron de manera similar al testigo en todas las variables evaluadas. Cuando se evaluó el efecto de la sacarosa, el número de tubérculos, el porcentaje de explantes diferenciados y la masa fresca no mostraron diferencias estadísticas significativas. La masa seca tuvo la mejor respuesta con una concentración de 60 g L⁻¹ de sacarosa.

Los anteriores resultados coinciden con los obtenidos por George (1996), quien reporta que la utilización de 30 a 60 g L⁻¹ de sacarosa es satisfactoria para la formación de microbulbos y que mayores concentraciones pueden incrementar la dormancia. Aún se desconoce el mecanismo por el cual la planta traslada la señal de alta concentración de sacarosa. En *Lilium*, probablemente afecta la partición de materia seca por su efecto osmótico; en consecuencia se estableció como mejor medio

Tabla 3. Efecto de la kinetina y varias concentraciones de sacarosa sobre la proliferación de microbulbos, porcentaje de germinación, masa fresca y masa seca en *Lilium* sp.

Factor	Número de microbulbos	Explantes diferenciados (%)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
A. Kinetina (mg L⁻¹)				
0.0	2.1b*	75	0.10b	0.017b
1.0	3.9a	75	0.17a	0.032a
3.0	1.6b	75	0.12b	0.021b
5.0	1.5b	53	0.07b	0.01b
Media general		69.5		
B. Sacarosa (g L⁻¹)				
30	3.1a	90.2a	0.145a	0.018b
60	3.3a	91.6a	0.165a	0.031a
90	3.6a	87.5a	0.189a	0.019b
Media general	3.3	89.7	0.166	
Interacciones				
A*B	NS	NS	NS	NS

*Promedios con letras diferentes, presentaron diferencia significativa por el test de Duncan ($P < 0.05$).

para la proliferación y desarrollo de microbulbos el medio MS suplementado con 1 g L⁻¹ de kinetina y 60% de sacarosa (Figura 2D).

Aclimatización de microbulbos

Se logró el establecimiento de la metodología para la aclimatización y el endurecimiento de los microbulbos obtenidos a partir de segmentos de escamas de *Lilium* sp, para los cuales durante la fase de aclimatización se obtuvo un prendimiento del 96.4%. Con relación a las variables de crecimiento se encontró que la formación del primer minibulbo tomó un lapso de tiempo de 45 días, al cabo de los cuales las plántulas formaron en promedio 3.5 hojas, alcanzaron una altura de 8 cm y los minibulbos tuvieron un peso de 0.85 g (Figuras 1, 2E y 2F). En *Lilium* así como en otras plantas de bulbo, se debe producir un proceso de acumulación de carbohidratos, lo cual se realiza mediante forzamiento en invernadero hasta obtener una planta madura que tenga la capacidad de formación de flores.

CONCLUSIONES

- Para la inducción y diferenciación de microbulbos los mejores resultados se obtuvieron en el medio MS enriquecido con 0.1 mg L⁻¹ de ANA.
- Para la proliferación y desarrollo de los microbulbos in vitro se determinó como óptimo el medio MS suplementado con kinetina 1 g L⁻¹ y 60% de sacarosa.
- Durante la aclimatización se logró un 96.4% de supervivencia y después de 45 días se formó el primer minibulbo de lirio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al sistema de investigación y desarrollo de la Universidad Católica de Oriente por el apoyo financiero para el desarrollo de la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Asocolflores. 2003. Exportación de flores de Colombia hacia el mercado norte americano. Boletín Noticias Frescas. Publicultural. Bogotá.
- Chow, Y.; Selby, C. y Harvey, B. 1992. Stimulation by sucrose of *Narcissus* bulbil formation in vitro. *Journal of Horticultural Sciences* 67:290-293
- Dabrowski, J.; Dabski, M. y kozak, D. 1992. The influence of some growth regulators on regeneration of lily bulbs *in vitro*. *Acta Horticulturae* 325:537-542
- George, E. 1996. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegenetics Ltd., Edington, p888-892
- Gerrits M. y De klerk, J. 1992. Bulb formation in plantlets of *Lilium speciosum* regenerated *in vitro*. *Acta Botanica Neerlandica* 39:9-17
- Godo, T.; Kobayashi, K.; Tagami, T.; Matsui, K. y Kida, T. 1996. *In vitro* propagation utilizing suspension cultures of meristematic nodular cell clumps and chromosome stability of *Lilium x formolongi* hort. *Scientia Horticulturae* 72:193-202
- Lian, M.; Chakrabarty, D. y Paek, K. 2003. Bulblet formation from bulb scale segments of *Lilium* using bioreactor system. *Biologia Plantarum* 46(2):199-203

- Linsmaier, E. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18:100-127
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Nhut, D. 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudobulb culture. *Plant Cell Reports* 17:913-916
- Pelkonen, V. 2005. Biotechnological approaches in lily (*Lilium*) production. University of Oulu, Department of Biology, p63
- Pérez, P. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas, La Habana, p53
- Raven, J. 1979. The possible role of membrane electrophoresis in the polar transport of IAA and other solutes in plant tissues. *New Phytologist* 82:285-291
- Stimart, D. y Ascher, P. 1978. Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 103:182-184
- Takayama S. y Misawa M. 1979. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. *Physiologia Plantarum* 46:184-190
- Varshney, A.; Dhawan, V. y Srivastava, P. 2000. A protocol for *in vitro* mass propagation of Asiatic hybrids of lily through liquid stationary culture. In *In Vitro Cell and Developmental Biology* Plant 36:383-391
- Vreugdenhil, D. y Helder, H. 1992. Hormonal and metabolic control of tuber formation. En: Karssen, C.; Van Loon, L. y Vreugdenhil, D. (Ed). *Progress in Plant Growth Regulation*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p393-400
- Welander, M. 1988. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. *Journal of Plant Physiology* 132:738-744
- White P. 1963. *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. Ronald Press, New York, p228